



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Effekter av bisfenol A på råttors ovarier

Sofia Katarina Ekoutsidou

*Uppsala
2017*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2017:25*

Effekter av bisfenol A på råttors ovarier

The effects of bisphenol A on rat ovaries

Sofia Katarina Ekoutsidou

Handledare: Sara Persson, Institutionen för kliniska vetenskaper, avdelningen för reproduktion

Biträdande handledare: Yongzhi Guo och Renée Båge, Institutionen för kliniska vetenskaper, avdelningen för reproduktion

Examinator: Ulf Magnusson, Institutionen för kliniska vetenskaper, avdelningen för reproduktion

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Delnummer i serie: Examensarbete 2017:25

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Bisfenol A, BPA, reproduktion, råttor, ovarier, lågdoseffekt, icke-monton dos-responskurva

Key words: Bisphenol A, BPA, reproduction, rats, ovaries, low dose effect, non-monotonic dose response curve

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Bisfenol A (BPA) är en vanligt förekommande kemikalie i vår närmiljö, som bland annat används i plastflaskor, matbehållare, tandfyllningsmaterial, läskburkar, konservburkar, vattenrör och kopieringspapper. BPA är en hormonellt aktiv substans med bland annat östrogena egenskaper och har i flera experimentella studier rapporterats orsaka negativa hälsoeffekter. Ett område som väckt särskilt intresse är dess inverkan på reproduktionsorganen då reproduktionsstörningar och infertilitet är ett hälsoproblem som finns spritt världen över.

Då allt fler studier rapporterade negativa effekter av BPA sänkte den Europeiska myndigheten för livsmedelssäkerhet (European Food Safety Authority, EFSA) gränsen för dagens tolerabla dagliga intag (TDI) från 50 mikrogram per kilo kroppsvikt per dag ($\mu\text{g/kg/d}$) till ett preliminärt TDI på 4 $\mu\text{g/kg/d}$. Det förekommer dock en diskussion kring huruvida BPA följer en icke-monoton dos-responskurva och har skadliga effekter i lägre doser än vad man tidigare trott. Detta har fått delar av forskarvärlden att ifrågasätta dagens nya TDI för BPA. Syftet med denna studie var att undersöka om låga doser BPA under utvecklingen orsakar effekter på morfologin i ovarier från vuxna honliga råttor, som modell för människa, efter exponering under fostertid samt neonatal period.

Dräktiga råttor exponerades för olika doser av BPA (0,5 $\mu\text{g/kg/d}$, 50 $\mu\text{g/kg/d}$ och kontrollgruppen fick vatten innehållande 1 % etanol) via dricksvattnet från dräktighetsdag 3,5 till postnataldag 22. På så vis exponerades honlig avkomma via placenta *in utero* samt via laktation. Totalt analyserades ovarier från 27 honliga råttungar, varav 8 exponerades för lägre dos, 8 för högre dos samt 11 för kontroll. Råttungarna hölls till vuxen ålder och avlivades 52 veckor gamla, då de befann sig i diöstrus. Efter avlivning dissekerades ovarier fram. Ovarierna vägdes och bedömdes histopatologiskt. Skillnader mellan varje dosgrupp och kontrollgruppen analyserades med ANOVA och parvisa jämförelser utfördes med t-test.

Resultaten i denna studie visade att exponering för BPA under tidig utveckling leder till en ökad ovarievikt hos råttor exponerade för 50 $\mu\text{g/kg/d}$ ($p < 0,05$). Inga signifikanta skillnader kunde ses mellan de exponerade grupperna och kontrollgruppen avseende antalet antrala folliklar, corpora lutea (CL), atretiska folliklar eller förekomst av multioocyter i folliklar.

Då ingen övrig skillnad i ovarierna kunnat påvisas i denna studie är det svårt att förklara vad viktökningen kan bero på. Man kan spekulera i att det skulle kunna ha orsakats av skillnad i CL-storlek eller skillnader i övriga follikelstadier. Då detta endast är en inledande studie av dessa ovarier föreslås att dessa parametrar är något som undersöks vidare i framtida utvärdering av ovarierna. Att inga signifikanta skillnader kunnat påvisas avseende morfologiska variabler kan dock också vara på grund av för låg power i studien. Dessa resultat skiljer sig från vad andra studier inom detta område kommit fram till. För att med säkerhet kunna uttala sig om eventuella morfologiska effekter av BPA på råttors ovarier krävs att fler studier utförs på området och att dessa är mer standardiserade.

SUMMARY

Bisphenol A (BPA) is a chemical in our environment, which is commonly used in food contact applications such as plastic bottles, food containers, soda cans, water pipes, as well as filling materials, copy paper etc. BPA is a hormonally active substance with estrogenic properties and has in several studies been reported to cause widespread adverse health effects. One area that has attracted interest is the possible effects of BPA on the reproductive organs, as reproductive disorders and infertility is a health problem that is spread and increasing worldwide.

As more studies reported adverse effects of BPA the European Food Safety Authority (EFSA) decided to lower the limit for tolerable daily intake (TDI) from 50 µg/kg bodyweight/day to a preliminary TDI at 4 µg/kg/d. However, there is an ongoing debate whether the effects of BPA follow a non-monotonic dose response curve and therefore has harmful effects at lower doses than previously thought. This hypothesis has divided the scientific community and has made some scientists question the current TDI for BPA. The purpose of this study was to investigate whether low-dose developmental BPA exposure causes morphological effects on the ovaries of adult female rats.

Pregnant rats were exposed to different doses of BPA (0,5 µg/kg/d, 50 µg/kg/d and the control group was given water containing 1% ethanol) in drinking water from gestational day 3.5 to postnatal day 22. Thus, the offspring were exposed through the placenta *in utero* and via lactation to mimic the way of human exposure. In total, 27 female pups from these litters were divided into three exposure groups: lower dose (n = 8), higher dose (n = 8) and control (n = 11). The pups were held until adulthood and sacrificed at 52 weeks of age, when they were in diestrous. The ovaries were dissected, weighed and assessed histopathologically. Differences between each dose group and the control group were analyzed by ANOVA and pairwise comparisons were performed with t-test.

The results of this present study showed that exposure to BPA during early development leads to increased ovary weight in rat offsprings exposed to 50 µg/kg/d ($p < 0.05$). No significant differences between the exposed groups and the control group were observed regarding the number of antral follicles, corpora lutea (CL), atretic follicles or presence of multioocytes within follicles.

Since no other differences in the ovaries were found in this study, it is difficult to explain the increased weight. One can speculate that it could have been caused by an increase of CL size or differences between other follicular stages. As this is a preliminary study of these ovaries, it is suggested that these parameters are examined in future studies of these organs. The lack of significant differences regarding morphological variables could also have been caused by the low power of these variables. Our results differ from the results of other studies in this area. To assess the potential morphological effects of BPA on rat ovaries more standardized studies are required.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturoversikt.....	1
Bakgrund	1
Icke-monotona dos-responsförhållanden	1
Beräkning av LOAEL, NOAEL och TDI	2
Tolerabelt dagligt intag	3
Honlig reproduktionstoxicitet	4
Ovariemorfologi	5
Ovaretotoxicitet, låga doser.....	6
Ovaretotoxicitet, höga doser	8
Material och metoder	11
Kemikalier	11
Djur.....	11
Exponering	11
Histologisk analys	12
Utvärdering av ovariemorfologi	12
Statistisk analys	13
Resultat.....	13
Diskussion	16
Konklusion	21
Referenser.....	22

INLEDNING

Bisfenol A (BPA) är en kemikalie som framförallt används för att tillverka polykarbonat- och epoxiplaster, vilka förekommer i många konsumentprodukter. Polykarbonatplast används bland annat i plastflaskor, matbehållare, CD- och DVD-skivor och tandfyllningsmaterial. Epoxiplast används bland annat i elektronik, byggmaterial, läskburkar, konservburkar och vid renovering av vatten- och avloppsrör. BPA finns också i kopieringspapper, kvitton och biljetter (Kemikalieinspektionen, 2013).

Då BPA är en vanligt förekommande kemikalie exponeras vi människor kontinuerligt i vårt vardagliga liv. Europeiska myndigheten för livsmedelssäkerhet (European Food Safety Authority, EFSA) har beräknat att högexponerade individer utsätts för 1,01–1,06 µg/kg/d (män och kvinnor) och 1,26–1,45 µg/kg/d (barn i åldern 3–10 år samt tonåringar) och anger att största vägen för exponering är peroral via föda (EFSA CEF Panel, 2015). Att BPA förekommer i livsmedel kan förklaras av att kemikalien migrerar från matbehållare och förpackningar till dess innehåll. Exempelvis finns studier som hardokumenterat migration av BPA från insidan av konservburkar till maten (Brotons *et al.*, 1995; Takao *et al.*, 2002). Takao *et al.* (2002) visar i sin studie att ju högre temperatur en konservburk utsätts för desto större mängd BPA läcker ut. I andra studier har det visats att det förekommer mätbara nivåer i mänskliga kroppsvätskor och vävnader. Exempelvis har Ikezuki *et al.* (2002) och Schonfelder *et al.* (2002) påvisat BPA i serum från både vuxna människor och foster, i follikelvätska samt i amnionvätska.

Det är sedan länge känt att BPA är en hormonellt aktiv substans med bland annat östrogena egenskaper (Kemikalieinspektionen, 2013; Vandenberg *et al.*, 2012; vom Saal *et al.*, 2007), vilket har genererat flertalet studier för att undersöka dess effekter på levande organismer. Ett område som har studerats särskilt är dess inverkan på könsorganen, då en misstanke finns att exponering av BPA kan ha en koppling till reproduktiva störningar (Peretz *et al.*, 2014).

Det förekommer en diskussion kring huruvida BPA har skadliga effekter i lägre doser än vad man tidigare trott, vilket har fått delar av forskarvärlden att ifrågasätta dagens tolerabla dagliga intag (TDI) för BPA. Flera studier har rapporterat att BPA kan ge effekter i låga doser. Dock anser EFSA att dessa studier inte ger en tillräckligt övertygande grund för att i dagsläget ytterligare sänka gränsen för dagens TDI (EFSA CEF Panel, 2015).

Syftet med denna studie var att undersöka om låga doser BPA orsakar effekter på ovariers morfologi från vuxna honliga råttor, som modell för människa, efter exponering under fostertid samt neonatal period.

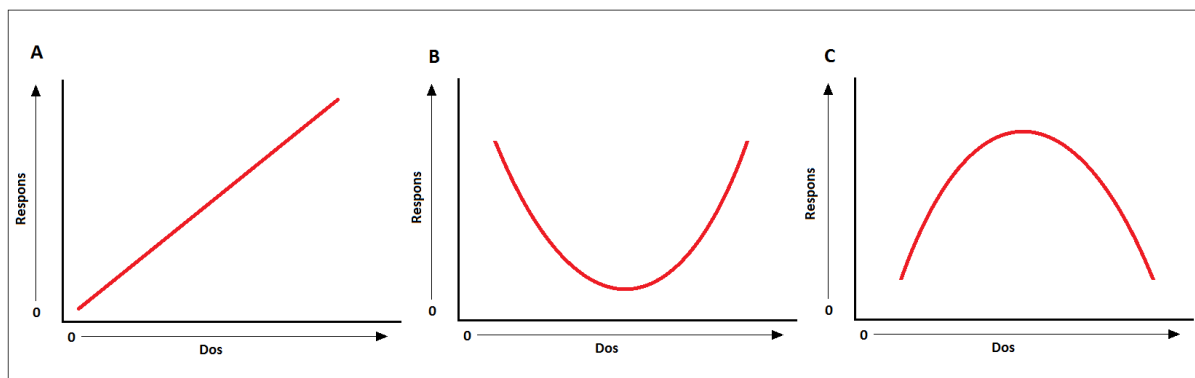
LITTERATURÖVERSIKT

Bakgrund

Icke-monotona dos-responsförhållanden

För att kunna förutsäga effekten av en kemikalie måste man förstå hur dess dos-responskurva ser ut. I en så kallad monoton dos-responskurva, där effekterna kan vara linjära eller icke linjära,

ändrar lutningen på kurvan aldrig riktning. Detta innebär att när en kemikalie följer en monoton dos-responskurva kommer man se en ökande respons vid en ökande dos (figur 1A). I en så kallad icke-monoton dos-responskurva (non-monotonic dose response curve, NMDRC) ändras lutningen på kurvan då dosen ökar. En NMDRC kan exempelvis vara U-formad. Detta innebär en respons vid både låga samt höga doser av ämnet i fråga (figur 1B). En NMDRC kan också ha en form av ett inverterat U, vilket innebär att högst respons fås vid intermediära doser (figur 1C). Då en kemikalie följer en NMDRC ses skilda eller motsatta effekter vid olika doser. Effekterna av höga doser kan således inte användas för att bedöma huruvida låga doser genererar effekter eller vad de effekterna förväntas vara (Vandenberg *et al.*, 2012).



Figur 1. A. Monoton dos-responskurva. B. Icke-monoton dos-responskurva, U-formad. C. Icke-monoton dos-responskurva, i form av inverterat U.

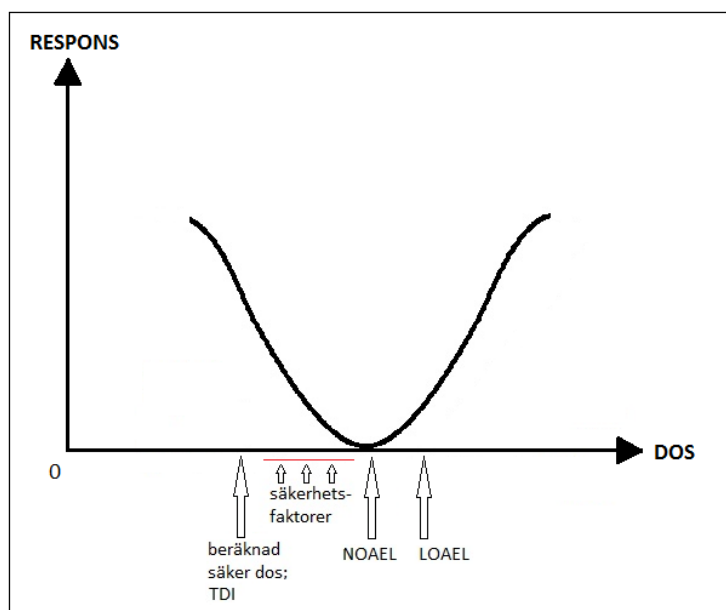
Det är en pågående debatt om huruvida effekten av BPA följer en icke-monoton dos-responskurva eller ej. Vandenberg *et al.* (2012) anför i sin review att så är fallet, medan EFSA antar en mer försiktig inställning till dess existens (EFSA CEF Panel, 2015). I dagsläget finns flertalet studier som utvärderat effekten av låga doser BPA och som anser sig påvisat en icke-monoton dos-responskurva (Hass *et al.*, 2016; Mandrup *et al.*, 2016). Många studier som har testat denna hypotes har granskats av EFSA, som har kommit fram till att tillgängliga data inte ger evidens för att BPA följer en NMDRC för studerade utfall. EFSA menar således att det inte finns evidens för att låga doser av BPA har effekter på reproduktion och utveckling, neurotoxicitet/beteendeeffekter, metabola effekter eller proliferativa förändringar i juverkörtlar (EFSA CEF Panel, 2015).

Vad som anses vara låg dos respektive hög dos skiljer sig mellan olika studier. I detta arbete följs en definition som används av Chapel Hill expertpanel (vom Saal *et al.*, 2007) samt andra forskargrupper (exempelvis Peretz *et al.*, 2014; Vandenberg *et al.*, 2013). Låg dos BPA definieras som ≤ 50 mg/kg/d, vilket är det nuvarande värdet på LOAEL för kemikalien (se förklaring nedan). Hög dos BPA definieras således som >50 mg/kg/d.

Beräkning av LOAEL, NOAEL och TDI

Vid toxicitetsstudier för olika kemikalier fastställer man Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL), vilket innebär den lägsta exponeringsnivå som ger upphov till observerbara

negativa effekter för en viss kemikalie. Därefter fastställer man kemikalins No Observed Adverse Effect Level (NOAEL), som är den högsta exponeringsnivå som inte ger upphov till observerbara negativa effekter. Baserat på LOAEL eller NOAEL görs sedan beräkningar som tar hänsyn till variabler såsom exempelvis art- och ålderskillnader etc. Dessa beräkningar genererar en referensdos som antas vara säker vid human exponering. Ofta blir denna referensdos 3–1000 gånger lägre än NOAEL. Referensdosen ligger till grund för TDI, vilket är en uppskattning av hur mycket av en substans som en människa kan konsumera dagligen hela livet utan risk för hälsan. TDI antas således vara säker trots att den är beräknad och inte testad för kemikalien i fråga. Om en kemikalie följer en monoton dos-responskurva är detta ett acceptabelt resonemang. Följer dock en kemikalie en icke-monoton dos-responskurva är denna tankegång inte lämplig (figur 2).



Figur 2. Figuren visar problematiken med beräkning av TDI vid en icke-monoton dos-responskurva. TDI = Tolerabelt dagligt intag, NOAEL = högsta exponeringsnivå som inte ger upphov till observerbara negativa effekter för en viss kemikalie, LOAEL = lägsta exponeringsnivå som ger upphov till observerbara negativa effekter för en viss kemikalie. Omarbetad från Vandenberg et al. (2012).

Tolerabelt dagligt intag

På grund av ökande antal vetenskapliga artiklar som pekat ut BPA som en hälsofara utförde EFSA:s expertpanel CEF (Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids) en omfattande toxikologisk utvärdering av kemikalien. I januari 2015 publicerades rapport där EFSA konstaterade att ett dagligt intag på mindre än 4 mikrogram per kilogram kroppsvikt per dag ($\mu\text{g/kg/d}$) inte utgör en hälsorisk för människor. Det tidigare fastställda TDI på $50 \mu\text{g/kg/dag}$ sänktes därmed i februari 2015 till ett nytt preliminärt TDI på $4 \mu\text{g/kg/d}$, i väntan på att fler studier ska utföras. Det uppskattades att högsta vardaglig exponering är tre till fem gånger lägre än det nya fastställda TDI (EFSA CEF Panel, 2015).

CEF-panelen anser att det finns vetenskapligt stöd för att höga doser (hundratals gånger högre än TDI) orsakar skadliga effekter på lever och njurar samt att det även kan ha effekt på juvervävnad hos djur. Studier som utvärderat andra effekter, exempelvis på reproduktionsorgan, nervsystemet och immunsystemet samt utveckling av cancer har inte visat lika övertygande data men har heller ej kunnat uteslutas. Det bedömdes även att tillgänglig vetenskapliga data vid tiden för rapporten inte kunde styrka teorin om att BPA har effekter vid lägre doser, dvs. det kunde inte styrkas att kemikalien följer en icke-monoton dos-responskurva (EFSA CEF Panel, 2015).

Flera studier har rapporterat effekter vid låga doser. Exempelvis har man i två studier exponerat råttor under fostertid samt laktation för låga och höga doser av BPA och i båda studier kunnat se effekt av låga doser på utvecklingen i olika aspekter (Hass *et al.*, 2016; Mandrup *et al.*, 2016). Honliga råttor som exponerades för låga doser av BPA (25 µg/kg/d) hade en högre vikt då de nådde vuxen ålder samt utvecklade ett mer hanligt beteende. Hanliga råttor som exponerats för låga doser av BPA (25 µg/kg/d) fick ökad tillväxt av juvervävnad samt minskat antal spermier i vuxen ålder. Ingen av dessa effekter gick att påvisa vid de högre doserna av BPA (5 och 50 mg/kg/d) (Hass *et al.*, 2016). Mandrup *et al.* (2016) visade att äldre honliga råttor som exponerats för 250 µg/kg/d under fostertid samt laktation utvecklade förändringar i juvervävnaden som skulle kunna vara tidigt stadium av bröstcancer. Dessa förändringar kunde inte ses vid högre exponeringsdoser (5 och 50 mg/kg/d) (Mandrups *et al.*, 2016). Båda studier anser sig därmed ha stöd för att BPA följer en icke-monoton dos-responskurva (Hass *et al.*, 2016; Mandrup *et al.*, 2016).

Hass *et al.* (2016) samt Mandrup *et al.* (2016) anser att de allvarliga effekter som visas i deras studier vid låg exponering (25 respektive 250 µg/kg/d) visar att ett TDI på 4 µg/kg/d inte ger tillräcklig marginal för att skydda människor och att en större säkerhetsfaktor bör användas. National Food Institute vid Technical University of Denmark är av samma åsikt och i en utvärdering av EFSA:s rapport anför de att man bör sänka TDI ytterligare, till 0,7 µg/kg/d eller lägre, för att skydda människor från BPA:s hormonstörande effekter (National Food Institute, 2015).

Honlig reproduktionstoxicitet

BPA har i olika studier rapporterats ha spridda negativa hälsoeffekter och klassas som ett hormonstörande ämne. WHO:s Internationella program för kemikaliesäkerhet har definierat ett hormonstörande ämne som ”ett kroppsfrämmande ämne eller blandning som påverkar funktionen hos hormonsystemet och därmed ger upphov till negativa effekter i en hel organism, eller dess avkomma, eller (sub)populationer” (Bergman *et al.*, 2013 för WHO/UNEP). Många processer i kroppen styrs av hormoner vilket ger utrymme för flera potentiella negativa effekter av hormonstörande kemikalier. Den känsligaste perioden för exponering av hormonstörande ämnen är under tidig utveckling då organogenes sker samt under postnatal period då vävnader differentieras (Vandenberg *et al.*, 2013). Ett område som är väl studerat är BPA:s effekter på reproduktion då reproduktionsstörningar och infertilitet är ett hälsoproblem som finns spritt världen över.

Det finns studier som rapporterar samband mellan exponering för låga doser av BPA och dysfunktionella effekter i honliga reproduktionsorgan. Exempelvis har Wang *et al.* (2014) rapporterat att daglig exponering för låg dos BPA under andra halvan av fostertiden leder till yngre ålder för första östrus, förkortar tiden för östrus samt ökar tiden för metöstrus och diöstrus hos möss i jämförelse med kontrollgruppen. I samma studie kunde man även påvisa minskat antal födda ungar samt ökad dödlighet bland ungar vid lågdosexponering av BPA (Wang *et al.*, 2014). Dessa fynd menar författarna tyder på att daglig exponering av BPA kan utgöra en risk för infertilitet.

Hormonstörande ämnen kan påverka fertilitet genom flertalet olika mekanismer, exempelvis genom hypotalamus, hypofysen, könsorgan och gonader hos båda könen. Ovariet är särskilt intressant att studera då det är ett dynamiskt organ som står under kontinuerlig inverkan av ett väl reglerat system av hormoner. I studier av hormonstörande ämnen har man sett att flera kemikalier har negativa effekter på ovarier och dess folliklar. Störningar i utvecklingen av dessa folliklar kan vara en möjlig orsak till infertilitet i yngre åldrar hos kvinnor. Kvinnor föds med en pool av primordialfolliklar, innehållande oocyter i sina ovarier, som minskas under livets gång och ska räcka under den fertila perioden i livet (Hammar *et al.*, 2006).

Trots att mycket forskning bedrivits för att utvärdera BPA:s effekt på reproduktion finns det i dagsläget endast ett begränsat antal studier som tittat på just effekter av denna kemikalie på follikelutveckling i råttors ovarier (se sammanställning tabell 1). Detta gör det till ett särskilt intressant område att studera.

Ovariemorfologi

Ovarier består framförallt av välvaskulariserad bindväv. Nerbäddat i bindväven finns folliklar i olika utvecklingsstadier, innehållande oocyter. Terminologin och definition av dessa folliklar kan skilja sig något mellan olika studier. Dixon *et al.* (2014) föreslår en definition av olika follikelstadier som de anser bör användas vid toxikologisk utvärdering av råttors ovarier. Det första utvecklingsstadiet utgörs av en primordialfollikel. En primordialfollikel definieras som en follikel bestående av en oocyt omgiven av ett lager platta pregranulosaceller. Denna utvecklas sedan till en primär follikel, som består av en oocyt omgiven av ett lager kuboidala granulosaceller. Follikeln utvecklas vidare till en sekundär follikel. Här är oocyten omgiven av två eller fler lager kuboidala granulosaceller. Mellan oocyten och granulosacellerna finns ett extracellulärt proteinlager som kallas zona pellucida. Stromala celler som omger granulosacellerna har nu utvecklats till två separata lager av celler. Närmast granulosacellerna sitter theca internaceller, som i sin tur omges av theca externaceller. Så småningom börjar ett vätskefyllt hålrum utvecklas bland granulosacellerna. Innan det har utvecklats till ett sammanhängande antrum kallas follikeln för preantral follikel, vilket enligt Dixon *et al.* (2014) fortfarande är en sekundär follikel. Det sista follikelstadiet kallas här för antral follikel, men man kan i litteraturen se även andra namn såsom tertiär, mogen eller Graafsk follikel. I denna follikel har ett sammanhängande hålrum bildats i granulosacellerna. Granulosaceller bildar en vägg runt om oocyten, vilken kallas cumulous oophorus och bildar en stjälk som sticker ut i

antrum. Innan ovulering bryts cumulous oophorus ner och oocyten är fri i antrum (Dixon *et al.*, 2014).

Efter ovulering kollapsar follikelväggen som består av kvarvarande granulosa- och thecaceller. Den tidigare follikeln omvandlas till en corpus luteum (CL). Direkt efter ovulering läcker det blod från kapillärer i theca interna in i follikellumen och bildar corpus hemorrhagicum. Bindväv från stroma kommer sedan att invadera corpus hemorrhagicum. Granulosa- och theca interna kommer därefter att differentieras till granulosa lutein- och theca luteinceller, vilket kallas luteinisering. Dessa luteinceller förändras morfologiskt då de ökar i storlek och fylls med lipiddroppar. Granulosa luteinceller är stora och är ofta mer centralt lokaliserade, medan theca luteinceller är mindre, mörkare i färgen och mer perifert lokaliserade (Ross & Pawlina, 2011).

Endast ett fåtal folliklar mognar och ovulerar, de flesta kommer att degenerera och försvinna genom en förprogrammerad process som kallas atresi. En follikel kan när som helst under sin mognad bli atretisk och försvinna. Vid atresi av primordialfolliklar och små växande folliklar kommer oocyten och granulosacellerna att minska i storlek och degenerera. Atretiska folliklar krymper successivt och försvinner till slut från ovariets stroma genom apoptos och fagocytos. Atresi av större växande folliklar börjar istället med degenerativa förändringar i follikelväggen som sekundärt leder till degeneration av oocyten (Ross & Pawlina, 2011).

Enligt Westwood (2008) är folliklar av alla utvecklingsstadier närvarande i ovariet i alla stadier av östruscykeln hos råttor, då de har en kort cykel på ca 4–5 dagar. Yoshida *et al.* (2009) utvärderade morfologiska förändringar hos friska vuxna råttor i olika stadier av cykeln och rapporterade att viss skillnad i antal folliklar av olika utvecklingsstadier kan ses.

Ovarietoxicitet, låga doser

I en av de senare studierna inom detta område kunde Santamaria *et al.* (2016) påvisa effekter i ovarier från råttor som exponerats för BPA under perinatalperioden. Författarna utvärderade påverkan på follikulogenesen hos honliga råttor som exponerats under perinatalperioden, via perorala doser av BPA (0,5 och 50 µg/kg/d, samt kontrollgrupp) till mödrarna. Råttungarna exponerades *in utero* från dräktighetsdag 9 samt via laktation till dag 21 efter födseln (PND 21; postnatal dag 21). De avlivades 90 dagar efter födseln. Man fann att våtvikten av ovarier från råttor exponerade för BPA, oavsett dos, var signifikant lägre än kontrollgruppens. Man kunde även påvisa en signifikant minskning i antalet primärfolliklar hos råttor som behandlats med BPA, oavsett dos, till skillnad från kontrollgruppen. Ingen skillnad kunde ses mellan exponerade grupper avseende antalet primordialfolliklar. Detta innebär enligt författarna att båda doser av BPA hämmade den initiala rekryteringsprocessen genom att påverka övergången från primordial- till primärfolliklar. Denna hämning av rekryteringsprocessen tycktes dock inte ha effekt på antalet preantrala och antrala folliklar eller förekomst av atretiska folliklar (Santamaria *et al.*, 2016). De kunde heller inte påvisa skillnader i totalantal oocyter mellan de olika grupperna. En skillnad kunde dock ses gällande antal CL mellan BPA-exponerade råttor, oavsett dos, och kontrollgruppen. Exponering för BPA orsakade en signifikant ökning i antal CL, vilket innebär ett ökat antal folliklar som ovulerar hos denna grupp. Santamaria *et al.* (2016)

menar att de två olika doserna av BPA påverkar den ökade ovulationen genom olika mekanismer. Man kunde påvisa ett signifikant lägre uttryck av androgen receptor (AR) i preantrala och antrala folliklar exponerade för 50 µg/kg/d, vilket Santamaria *et al.* (2016) tror skulle kunna resultera i en liten minskning i androgen påverkan med ökad ovulation som konsekvens. I gruppen exponerad för 0,5 µg/kg/d kunde ingen minskning i uttryck av AR påvisas, däremot sågs en ökning i uttryck av mRNA för receptorer för follikelstimulerande hormon (FSH) i ovarierna. Detta tror Santamaria *et al.* (2016) skulle kunna resultera i att folliklarna blir mer känsliga för FSH, vilket leder till en ökad mognad av folliklarna och polyovulering.

Dessa fynd skiljer sig från resultat i en studie av Gamez *et al.* (2015) där honliga råttor exponerades för BPA (3 µg/kg/d) från dräktighetsdag 0 till 21 dagar efter förlossning. Honlig avkomma från dessa råttor avlivades och utvärderades vid 30 dagars ålder. En signifikant ökning i totalantal folliklar hos råttor som exponerats för BPA kunde ses. Denna ökning härrörde i att antalet primär- och sekundärfolliklar var högre hos råttor exponerade för BPA än kontrollgruppen, medan antalet antrala folliklar istället var lägre. Antalet primordialfolliklar utvärderades inte. Dessa fynd menar Gamez *et al.* (2015) innebär att exponering av BPA stör antrala folliklars utveckling och resulterar i ökat antal atretiska folliklar, vilket också kunde påvisas med signifikant skillnad mellan grupperna. Till skillnad från Santamaria *et al.* (2016) kunde Gamez *et al.* (2015) inte påvisa skillnad i ovarievikt jämfört med kontrollgruppen.

Adewale *et al.* (2009) visade i deras studie att neonatal exponering av BPA, i doser på samma nivå som LOAEL och lägre, orsakade effekter på ovariers funktion hos råttor. Från PND 0 (födelse) till PND 3 injicerades honliga rättungar dagligen subkutant med låg dos BPA (50 µg/kg/d) samt en högre dos BPA (50 mg/kg/d). Mellan PND 148–169 (ca 21–24 veckors ålder) ovariektomiserades rättorna. Histologiska snitt av ovarierna utvärderades morfologiskt, och man fann flertalet effekter av BPA. Ovarier från honor som neonatalt exponerats för den högre dosen BPA (50 mg/kg/d) uppvisade onormal follikulogenes med follikeldegeneration, multinukleära celler i folliklar samt närvaro av hemorragisk vävnad. Signifikant färre ovarier (endast 36%) i denna grupp innehöll CL, vilket kan jämföras med negativ kontrollgrupp samt låg dos BPA där förekomsten var 100 %. CL uppstår efter ovulering, vilket tyder på att det inte är troligt att folliklarna i ovarier exponerade 50 mg/kg/d kunde ovulera. Ovarier från de honor som istället exponerats för den lägre dosen BPA (50 µg/kg/d) uppvisade alla stadier av follikelutveckling, men en del av rättorna hade hemorragiska folliklar (anges dock ej om signifikant). Ovarier i denna grupp bedömdes kunna ovulera. Man såg dock en trend mot en minskning i förekomst av CL, men detta var ej signifikant. Ovarier från både råttor som exponerats för den högre och den lägre dosen innehöll stora antrallinknade folliklar som utseendemässigt liknande ovariecystor (Adewale *et al.*, 2009).

Rodríguez *et al.* (2010) undersökte huruvida neonatal exponering för en låg dos (50 µg/kg/d) respektive högre dos (20 mg/kg/d) BPA stör tidig follikelutveckling hos råttor. Rättungar fick subkutana injektioner varannan dag, PND 1, 3, 5 och 7. Ungarna avlivades sedan PND 8 varvid ovarierna omhändertogs. Högre dos av BPA visade en signifikant minskning av

primordialfolliklar i jämförelse med kontrollgruppen, medan den lägre dosen av BPA inte fick denna effekt på ovarierna. Denna reduktion i primordialfolliklar hängde samman med en signifikant ökning av framförallt primärfolliklar (Rodríguez *et al.*, 2010). Med ledning av dessa resultat spekulerar författarna om att BPA skulle kunna leda till en ökad förbrukning av primordialfolliklar, vilket skulle kunna få konsekvensen att kvinnor blir infertila i allt yngre ålder än tidigare (Rodríguez *et al.*, 2010).

I en studie av Delclos *et al.* (2014) exponerades råttor peroralt för BPA för att utvärdera effekten av subkronisk tillförsel av kemikalien i både låga och höga doser i ett försök att få en bild av dess dos-responskurva. Råttorna exponerades *in utero* via daglig sondmatning av dräktiga honor från dräktighetsdag 6 fram till och med födsel. Därefter sondmatades råttungarna dagligen med BPA från PND 1 till och med avlivning, vilket skedde PND 90±5. Råttorna exponerades för ett spann av låga doser (2,5, 8, 25, 80, 260, 840 och 2700 µg/kg/d), två höga doser (100 och 300 mg/kg/d) och jämfördes med en negativ samt en positiv kontrollgrupp. Vid histopatologisk utvärdering av ovarierna kunde författarna enbart påvisa signifikanta effekter av BPA vid den högsta dosen (300 mg/kg/d), med en reduktion av antal antrala folliklar och CL, samt ökad förekomst av follikelcystor. Övriga exponeringsgrupper förblev opåverkade i jämförelse med negativ kontroll. Författarna kunde även rapportera en signifikant minskning av ovarievikten hos den högsta exponeringsgruppen, som ej kunde ses vid övriga doser (Delclos *et al.*, 2014).

Ovarietoxicitet, höga doser

Li *et al.* (2014) visade att exponering av höga doser av BPA i prepubertal ålder kan störa/hämma den normala utvecklingen av folliklar. 21 dagar gamla honliga råttor injicerades intraperitonealt dagligen i 7 dagar med olika doser BPA (10, 40 respektive 160 mg/kg samt kontroll). Råttorna avlivades vid 35 dagars ålder. Våtvikten av ovarierna var signifikant mindre i de högre exponeringsgrupperna (40 respektive 160 mg/kg/d) i jämförelse med kontrollgruppen. Minskningen av ovariers vikt kan enligt författarna bero på en reduktion av antal folliklar, framförallt gällande antrala folliklar och CL. Totalt antal folliklar i varje exponeringsgrupp minskade med ökande dos BPA och i jämförelse med kontrollgruppen kunde signifikant minskning ses i alla doseringsgrupperna (Li *et al.*, 2014). Likt Rodríguez *et al.* (2010) kunde även Li *et al.* (2014) se en signifikant minskning av antal primordialfolliklar. För Li *et al.* (2014) gällde denna minskning av primordialfolliklar från ovarier från råttor exponerade för högsta dosen, men inte i övriga exponeringsdoser. Primärfolliklar, antrala folliklar och CL minskade signifikant i alla exponeringsgrupperna. Antalet atretiska folliklar ökade vid exponering av 40 respektive 160 mg/kg/d. Dessa fynd tyder på att exponering av höga doser BPA i ung ålder kan störa den normala utvecklingen av folliklar enligt författarna. En minskning av primordialfolliklar antas kunna orsaka risk för störning i fertilitet i vuxen ålder (Li *et al.*, 2014).

Vid en studie där råttor exponerades för BPA via födan, i doser på 0, 60, 600 och 3000 mg/kg/d, från dräktighetsdag 15 till PND 10 kunde inga signifikanta effekter av kemikalien visas. Honliga råttungar avlivades vid 11 veckors ålder och histopatologisk utvärdering av ovarierna

gjordes. Man tittade på antal folliklar, CL samt förekomst av cystiskt förstörade atretiska folliklar och kunde inte påvisa effekter av BPA (Takagi *et al.*, 2004).

Tabell 1. Sammanställning av studier avseende morfologiska effekter av BPA på råttors ovarier

Djur, stam	Dos	n ^a	Admn.	Expo.	Avl./OE ^b	Primordial folliklar	Primär folliklar	Sekundär folliklar	Antrala folliklar	CL ^c	Atretiska folliklar	Ovari e-vikt	Referens
Råttor, Wistar	0,5 µg/kg/d 50 µg/kg/d	10-12	Peroral	GD ^d 9-21	PND 90	0 0	↓ ↓	0 0	0 0	↑ ↑	0 0	↓ ↓	Santamaria <i>et al.</i> (2016)
Råttor, Wistar	3 µg/kg/d	10	Peroral	GD 0-PND 21	PND 30	-	↑	↑	↓	-	↑	0	Gamez <i>et al.</i> (2015)
Råttor, Sprague Dawley	2,5–100 000 µg/kg/d ^f 300 mg/kg/d	18-23	Peroral, via sond	GD 6-PND 90±5	PND 90±5	- -	- -	- -	0 ↓	0 ↓	- -	0 ↓	Delclos <i>et al.</i> (2014)
Råttor, Long evans	50 µg/kg/d 50 mg/kg/d	8-10	Sub-kutan	PND 0-3	PND 148-169	- -	- -	- -	- -	0 ↓	- -	- -	Adewale <i>et al.</i> (2009)
Råttor, Wistar	50 µg/kg/ vad ^g 20 mg/kg/vad	≥ 8	Sub-kutan	PND 1, 3, 5 och 7	PND 8	0 ↓	0 ↑	0 0	- -	- -	- -	- -	Rodríguez <i>et al.</i> (2010)
Råttor, Wistar	10 mg/kg/d 40 mg/kg/d 160 mg/kg/d	12	Intra-peritoneal	PND 28-35	PND 35	- - ↓	↓ ↓ ↓	↓ ^h ↓ ^h ↓ ^h	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	0 ↑ ↑	0 ↓ ↓	Li <i>et al.</i> (2014)
Råttor, Sprague Dawley	60 mg/kg/d 600 mg/kg/d 3000 mg/kg/d	5	Peroral	GD 15-PND 10	PND 77	- - -	- - -	- - -	- - -	0 0 0	0 0 0	0 0 0	Takagi <i>et al.</i> (2004)

0 = signifikanta skillnader ej påvisade, - = ej studerat aktuell parameter, ^an = antal djur/grupp, ^b avl./OE = avlivning/ovariektomi, ^c CL = corpus luteum, gulkropp
^dGD = gestational day, dräktighetsdag, ^ePND = postnatal dag, ^f2,5, 8, 25, 80, 260, 840, 2700 och 100 000 µg/kg/d, ^g vad = varannan dag, ^h = kallas i denna studie för preantrala folliklar; antas vara sekundära folliklar då definition saknas i artikel

MATERIAL OCH METODER

Hantering och exponering av råttor för låga doser BPA (*in utero* samt under laktation) utfördes på Uppsala Universitet, vid institutionen för Arbets- och Miljömedicin, i syfte att utvärdera effekten på ben och fettväv. Ovarierna från dessa råttor dissekerades fram efter avlivning av forskare vid institutionen för kliniska vetenskaper, avdelningen för reproduktion vid Sveriges Lantbruksuniversitet och användes för utvärdering i denna studie.

Nedan beskrivs utförandet i korthet. För en mer utförlig beskrivning se Lejonklou *et al.* (2016).

Kemikalier

Bisfenol A, $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$, ($\geq 99\%$ renhet, CAS nr. 80-05-7, från Sigma-Aldrich) löstes i etanol (1% av total lösning) och späddes med väl genomspolat kranvatten till önskade koncentrationer.

Djur

Uppsala Djurförsöksetiska nämnd har godkänt denna studie enligt riktlinjer från the European Union legislation (Convention ETS123 och Directive 2010/63/EU).

Fyrtiofem stycken dräktiga 9 veckor gamla honliga Fischer 344 råttor hölls vid Uppsala Universitets djuranläggning. För att minska exponering av miljömässig BPA användes polysulfon-burar (Euro Standard IV) samt vattenflaskor av glas.

Dräktiga honor delades slumpmässigt in i de olika exponeringsgrupperna. En dräktig hona vistades per bur. Vid PND 4 jämnades kullarna ut till sex ungar per hona. Avvänjning gjordes vid tre veckors ålder, mödrarna avlivades och honliga ungar flyttade till burar med tre råttor per bur, uppdelade per exponeringsgrupp. För att undvika kulleffekt placerades råttor med samma moder i olika burar. Totalt användes 27 honliga unga råttungar, varav 8 exponerades för lägre dos, 8 för högre dos samt 11 för kontroll. Råttorna avlivades sedan vid 52 veckors ålder, då de befann sig i diöstrus. Ovarier från en råtta från kontrollgruppen fick räknas bort vid utvärdering av gonaderna då denna råtta befann sig i östrus vid tidpunkt för avlivning. Efter avlivning dissekerades ovarier fram. Ovarierna vägdes och fixerades i 4% buffrad formalin.

Foder och vatten fanns tillgängligt *ad libitum* och intaget registrerades per dräktig hona. Nivåer av fytoestrogener i fodret analyserades och var under Organization for Economic Co-operation and Development's (OECD) övre gräns.

Exponering

Dräktiga råttor delades in i tre grupper: lägre dos (0,5 µg/kg/d), högre dos (50 µg/kg/d) samt kontroll (vatten innehållande 1% etanol). Dessa råttor exponerades för BPA eller kontroll via dricksvatten från dräktighetsdag 3,5 till postnataldag 22. Därmed exponerades råttungar via placenta *in utero* samt via laktation.

Genom att mäta vattenåtgång hos moderdjuren beräknades ett genomsnitt av vad varje individuell råtta i de olika exponeringsgrupperna faktiskt fått i sig (tabell 2). Peroral administration valdes för att efterlikna den vanligaste vägen för human exponering.

Tabell 2. *Eftersträvad dos och verklig dos hos fyrtiofem dräktiga Fischer 344 råttor*

Exponering	Kontroll	Lägre dos	Högre dos
Dos i dricksvatten mg/l	0	0,0025	0.25
Eftersträvad dos µg/kg/d	0	0,5	50
Verklig dos (GD 3,5 till PND 22) µg/kg/d	0	0,404	40,1
Verklig dos (GD 3,5 till PND 0) µg/kg/d	0	0,272	26,9
Verklig dos (PND 0 till PND 22) µg/kg/d	0	0,530	52,7

Histologisk analys

Vänster ovarie fixerades i 4 % buffrad formalin i rumstemperatur och bäddades sedan in i paraffin. Ovarier seriesnittades (8 µm tjocka) och placerades på 6 objektglas, med 13–15 snitt per glas. Två objektglas per ovarie valdes ut och färgades med Hematoxylin-eosin-färgning, varav det ena glaset innehöll snitt från ovariets mittplan och det andra glaset snitt ca 208–240 µm från ovariets mittplan. Ett snitt per objektglas användes sedan för morfologisk utvärdering. Snitt för utvärdering valdes baserat på en strävan efter största möjliga diameter på ovarierna i kombination med en bra kvalitet på snittet. Ett medelvärde av folliklar och CL från två snitt per ovarie beräknades sedan.

Morfologisk förstahandsbedömning av de histologiska preparaten gjordes på fotografier på pappersutskrift (x20-förstoring upptryckt på A3-papper) och/eller datorskärm. Slutgiltig bedömning av preparaten gjordes i ljusmikroskop (Olympus), i upp till x40-förstoring.

Utvärdering av ovariemorfologi

Antal antrala folliklar, CL och atretiska folliklar räknades i två snitt per ovarie, av en och samma person. För varje ovarie räknades sedan ett medelvärde på antal CL och antrala och atretiska folliklar. All analys av preparaten gjordes utan vetskap om doseringsgrupp.

Klassificering av antrala folliklar gjordes enligt Dixon *et al.* (2014), som beskrivet ovan. Alla friska antrala folliklar beräknades. Antrala folliklar som bedömdes som friska hade ett välorganiserat granulosaacells lager med tätt arrangerade celler och inga pyknotiska celler. Folliklar bedömdes vara atretiska då pyknotiska celler observerades och/eller då celler uppvisade ett oorganiserat utseende. CL bedömdes enligt beskrivning i Ross & Pawlina (2011).

Statistisk analys

Skillnader mellan varje dosgrupp och kontrollgruppen med avseende på ovarievikt, antal antrala och atretiska folliklar samt antal CL och antal folliklar med multipla oocyter analyserades med ANOVA och parvisa jämförelser av minsta kvadrat-medelvärde utfördes med t-test (GLM procedure, SAS, Milltown USA). För ovarievikterna testades olika modeller med absolut och relativ vikt (för både vänster och höger ovarie samt totala ovarievikten), samt modeller där kroppsvikt inkluderades som en kovariat (ANCOVA). Alla resultat med ett p-värde mindre än 0,05 ansågs vara signifikant.

Analys av power för de morfologiska variablerna räknades ut med GLM power procedure, med $\alpha = 0,05$.

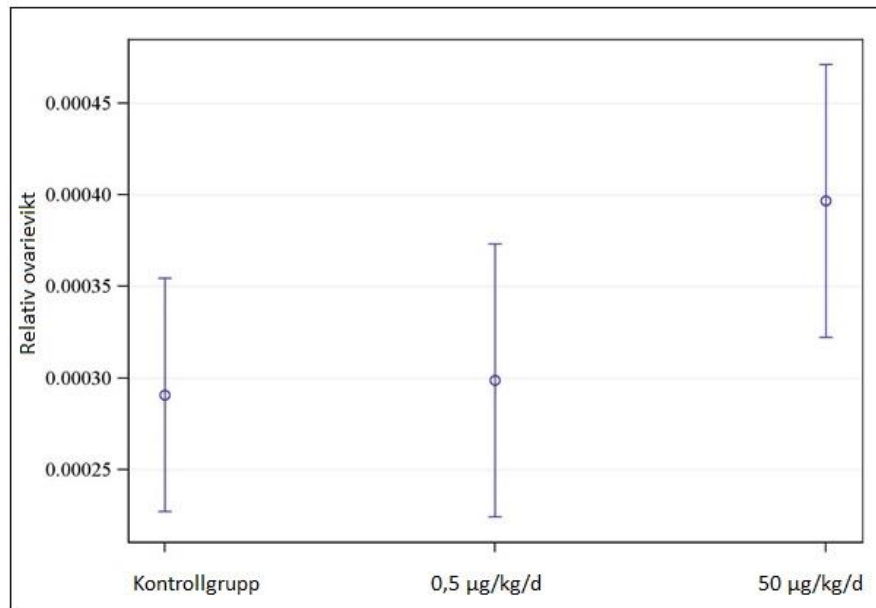
RESULTAT

I denna studie kunde en signifikant ökning i relativ ovarievikt (summan av vänster och höger ovarie/kroppsvikt) ses i gruppen exponerad för 50 $\mu\text{g/kg/d}$ i jämförelse med kontrollgruppen (se figur 3). Samma resultat erhöles oavsett vilken modell som användes, med undantag för modellen för höger ovarie med kroppsvikt som kovariat där p-värdet blev något högre än 0,05 ($p = 0,066$). Råttornas kroppsvikt skilde sig inte mellan grupperna.

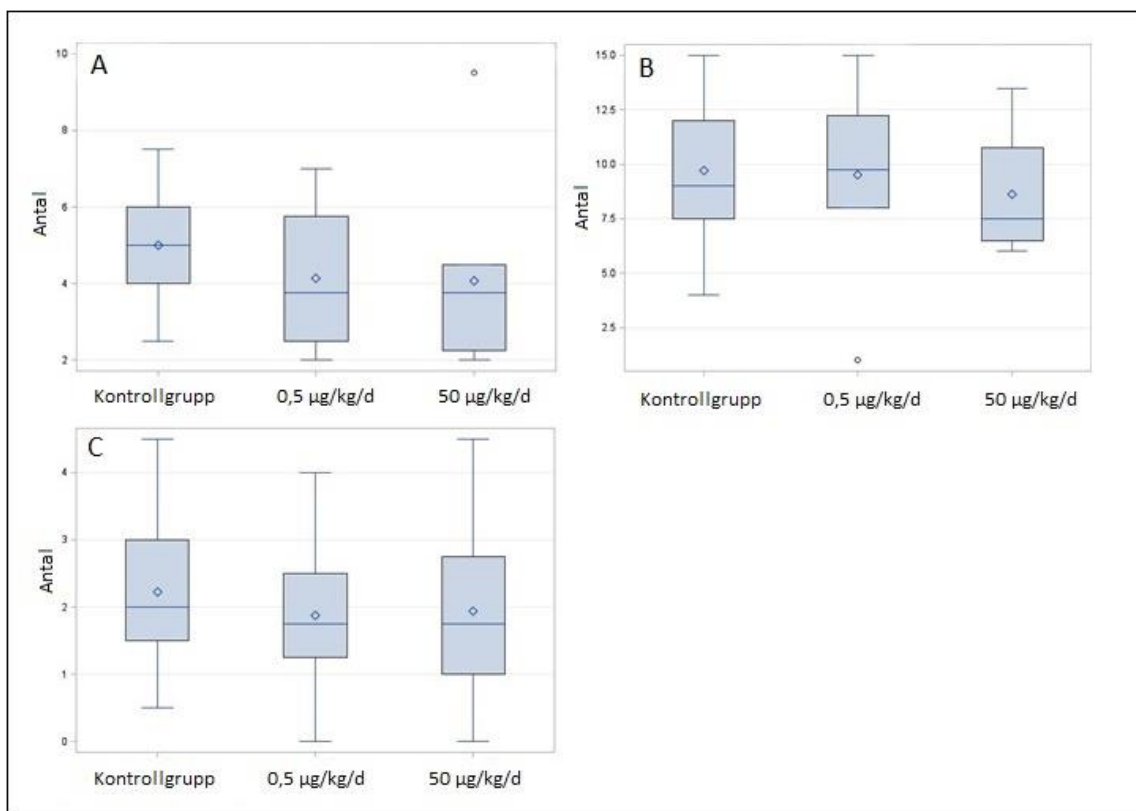
Ingen signifikant skillnad kunde ses mellan kontroll- och exponeringsgrupper med avseende på antalet antrala folliklar, CL och atretiska folliklar (se figur 4). Under arbetets gång noterades förekomst av folliklar med mer än en oocyt, men inte heller här kunde en skillnad mellan grupperna påvisas. Figur 5 och 6 illustrerar histologiska snitt från ovarierna i studien.

Sammanställning av medelvärden \pm standarddeviation för utvärderade parametrar kan ses i tabell 4. Power för de morfologiska variablerna varierade mellan 0,1–0,2.

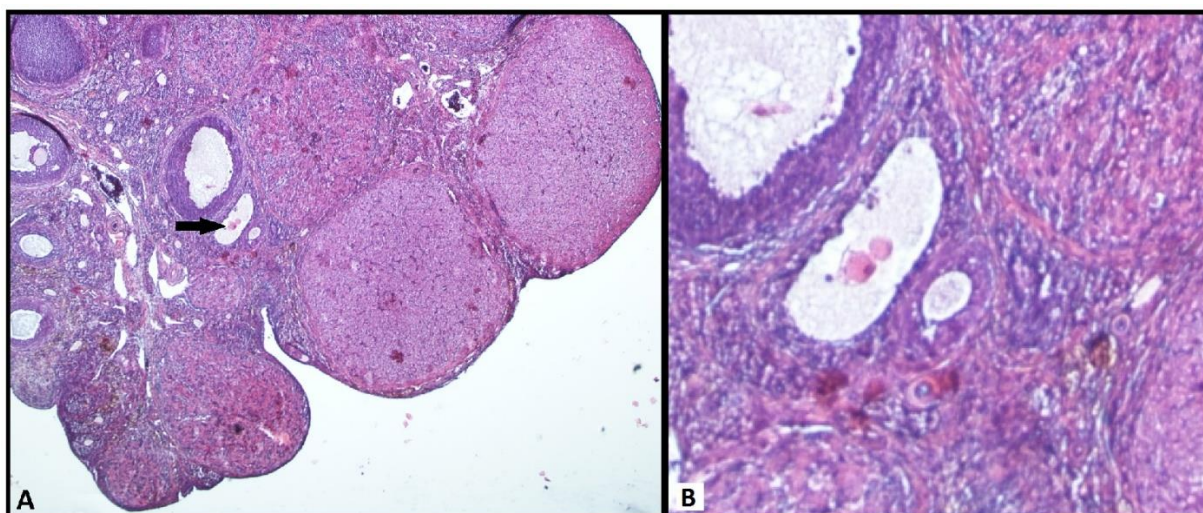
Pigmentinlagringar i form av lipofuscin kunde observeras på en del av preparaten.



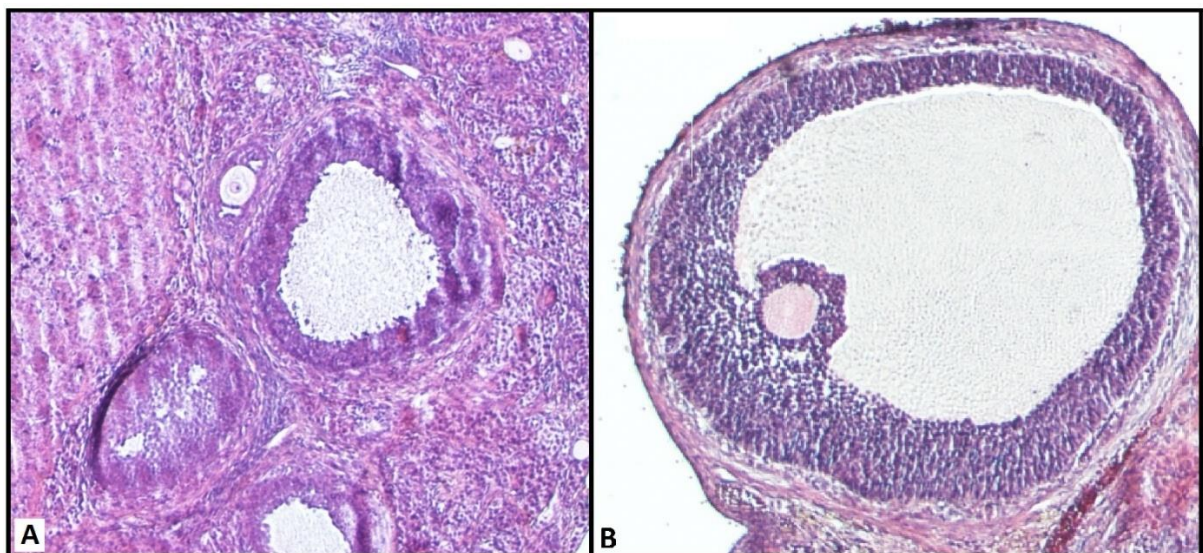
Figur 3. Medelvärde (minsta kvadrat-medelvärde) och 95 % konfidensintervall för relativ (total) ovarievikt.



Figur 4. Lådagram för medelvärde (punkt i boxen) och 95 % konfidensintervall för A. Antal antrala folliklar, B. Antal corpora lutea, C. Antal atretiska folliklar.



Figur 5. Histologiska snitt, x20-förstoring. A. Corpora lutea i ovarie exponerad för 50 $\mu\text{g/kg/d}$. Svart pil visar multioocyt i en follikel. B. Multioocyt i en follikel, uppförstorad bild.



Figur 6. Histologiska snitt, x20-förstoring. A. Atretisk follikel i ovarie från kontrollgrupp. B. Antral follikel i ovarie från kontrollgrupp, uppförstorad bild.

Tabell 4. Deskriptiv statistik (medelvärde \pm standarddeviation) för 52 veckor gamla råttthonor som exponerats för BPA in utero och via laktation.

	Doseringsregim		
	0,5 $\mu\text{g/kg/d}$ (n=8)	50 $\mu\text{g/kg/d}$ (n=8)	Kontroll (n=10)
Kroppsvikt (g)	211,3 \pm 8,5	223,0 \pm 20,4	217,7 \pm 10,7
Absolut ovarievikt (g)	0,063 \pm 0,016	0,087 \pm 0,026*	0,063 \pm 0,018
Relativ ovarievikt	0,000299 \pm 0,000086	0,000397 \pm 0,000124*	0,000291 \pm 0,000084
Antrala folliklar	4,1 \pm 1,8	4,1 \pm 2,3	5,0 \pm 1,4
CL	9,5 \pm 3,9	8,6 \pm 2,6	9,7 \pm 3,4
Atretiska folliklar	1,9 \pm 1,1	1,9 \pm 1,3	2,2 \pm 1,2
Multioocyter i folliklar	0,3 \pm 0,3	0,2 \pm 0,5	0,4 \pm 0,5

* $p < 0,05$ för absolut och relativ ovarievikt (vänster + höger ovarie) i grupp exponerad för 50 $\mu\text{g/kg/d}$ i jämförelse med kontrollgrupp

DISKUSSION

I denna studie kunde en signifikant högre ovarievikt ses hos råttor exponerade för 50 μg BPA/kg/d. Då ingen övrig skillnad i studerade parametrar kunnat påvisas blir det svårt se en möjlig förklaring till vad denna ökade vikt kan bero på. Man kan spekulera i om det skulle kunna orsakas av skillnader i övriga follikelstadier eller en skillnad i follikel- eller CL-storlek, vilket dock är parametrar som inte undersökts här. Man kan också tänka sig att det faktiskt förekommer en skillnad i de morfologiska variabler som utvärderats, men att vi inte lyckats påvisa detta på grund av för låg statistisk power i denna studie. Detta kan ha orsakats av ett för litet urval av djur, men också av små skillnader mellan exponeringsgrupper och kontrollgrupp.

Vad denna ökade ovarievikt skulle kunna ha för konsekvens för individen eller dess reproduktion är svårt att spekulera i eftersom det är svårt att förklara vad det kan ha orsakats av. Detta fynd skiljer sig från övriga studier, vilket är intressant. Santamaria *et al.* (2016) och Gamez *et al.* (2015), vars studiedesign liknar den i denna studie, rapporterade en minskad ovarievikt respektive ingen signifikant skillnad i ovarievikt. Delclos *et al.* (2014) kunde heller ej påvisa effekt på ovarievikten vid låga peroralt administrerade doser. Li *et al.* (2014) rapporterade en minskning av ovarievikt vid doser på 40 respektive 160 mg/kg/d. I detta fall bör man dock ta hänsyn till att BPA administrerats parenteralt samt att höga doser använts. Takagi *et al.* (2004) som också exponerade råttor för höga doser BPA kunde däremot inte se en signifikant skillnad på ovarievikt.

Ingen skillnad i effekt mellan exponeringsgrupp och kontroll avseende antal antrala folliklar, CL och atretiska folliklar kunde påvisas i vår studie, vilket skiljer sig från vad som kunnat

påvisas i andra studier. Santamaria *et al.* (2016), Gamez *et al.* (2015), Delclos *et al.* (2014) och Takagi *et al.* (2004) har alla tittat på peroral administrering av BPA i olika doser. Gamez *et al.* (2015) rapporterar fynd som tyder på en störd utveckling av antrala folliklar med ökad atresi som följd. Man kan spekulera i att detta skulle kunna påverka antalet antrala folliklar som kan ovulera och därmed ha en negativ effekt på fertiliteten. Dock har man i denna studie inte beräknat antal CL, vilket hade varit ett sätt att utvärdera om ovulationen påverkas eller ej. Santamaria *et al.* (2016) rapporterade också fynd som tyder på en störning i follikelutvecklingen med en hämning av övergång i utvecklingen från primordial- till primärfolliklar. Denna hämning tycktes dock inte ha effekt på antalet antrala folliklar, som inte skiljde sig åt mellan grupperna. Dessutom rapporterades en ökning i antal CL i båda exponeringsgrupper, vilket innebär en ökad ovulering. Gamez *et al.* (2015) har utvärderat en dos av BPA som volymmässigt ligger mellan de två doser Santamaria *et al.* (2016) rapporterar sina resultat vid, vilket gör dessa något motsatta fynd intressanta. Samma administrationsväg har använts, men exponeringsfönster och ålder för avlivning skiljer sig något åt vilket potentiellt kan ha påverkat resultaten. Delclos *et al.* (2014) som gjorde ett försök att fånga upp en lågdoseffekt av BPA genom att studera en serie av låga peroralt administrerade doser, kunde dock inte påvisa effekter avseende antal antrala folliklar och CL samt förekomst av cystiska folliklar. Övriga follikelstadier bedömdes ej i denna studie. Takagi *et al.* (2004) som utvärderat effekt av höga perorala doser rapporterar att de ej observerat någon effekt på follikulogenesen. I denna studie anges att en histopatologisk bedömning av ovarierna har gjorts, men inte om man har jämfört olika follikelstadier med varandra. Det är dock svårt att sätta in dessa resultat i sammanhanget då det faktum att man inte kunnat se effekter av höga doser inte motsäger tesen att BPA har effekter vid låga doser, förutsatt antagandet att kemikalien följer en icke-monoton dos-responskurva. Dessutom har endast fem råttor utvärderats histopatologiskt för att dra dessa slutsatser, vilket sänker styrkan i fynden.

Adewale *et al.* (2009) och Li *et al.* (2014) rapporterar tydlig påverkan på follikulogenes och minskning av CL, men då dessa studier använt sig av relativt höga doser och dessutom perenteral administration blir det svårt att extrapolera dessa fynd till vardaglig human exponering. Rodríguez *et al.* (2010) rapporterar en intressant reduktion i primordialfolliklar och ökning av framförallt primärfolliklar. Författarna spekulerar i att detta skulle kunna innebära en ökad förbrukning av poolen av primordialfolliklar, som i längden skulle kunna leda till att dessa tar slut för tidigt och resulterar i att kvinnor kan bli infertila allt yngre ålder än normalt. Även här blir det svårt att dra slutsatser om risken vid vardaglig human exponering då kemikalien administrerats subkutant och effekter enbart rapporterats vid relativt hög dos.

Det hade varit intressant att i vår studie undersöka om effekt hade kunnat ses på primordialfolliklar, primärfolliklar och sekundärfolliklar. För att kunna göra detta är en specialfärgning att rekommendera, vilket har varit utanför tidsrymd och budget då detta är en inledande studie som gjorts inom ramen för examensarbete. Förslagsvis är detta något som bör utvärderas i nästa steg.

I litteraturgenomgången fokuserades det på studier som tittat på morfologiska effekter av BPA på just råttors ovarier efter exponering under perinatal tid för att kunna jämföra med egna resultat i så stor utsträckning som möjligt. Det finns dock endast ett begränsat antal studier som fokuserat på detta. Jämförelsen av resultat mellan olika studier försvåras dessutom av att dessa studier har utförts med olika studiedesign (exponeringsfönster, administrationssätt, doser, tidpunkt för avlivning, etc.) samt med olika klassificering av follikelstadier. Sammanställning av tidigare forskningsfynd (tabell 1) visar på resultat som går i väldigt olika riktningar, vilket skulle kunna vara en följd av dessa vitt skilda studiedesigner.

Att resultat mellan olika studier skiljer sig åt kan delvis förklaras av administrationssätt. Pottenger *et al.* (2000) visar i sin studie att biotillgängligheten av BPA i den systemiska cirkulationen hos råttor blir olika vid olika administrationssätt. Råttor metaboliserar peroral giva av BPA framförallt genom s.k. första passageeffekt där enzym från tarmar och lever konjugerar BPA och utsöndrar dess metaboliter via galla i avföringen. Detta gör att man hos råttor får en markant mindre biotillgänglighet vid peroral tillförsel jämfört med intraperitoneal och subkutan administration, som i dessa fall undviker denna första passageeffekt (Kurebayashi *et al.*, 2003; Pottenger *et al.*, 2000). Perentral giva ger således en högre koncentration av okonjugerad BPA i ovarier (Li *et al.*, 2014).

Den största källan för exponering av BPA hos människor är via födan (EFSA CEF Panel, 2015). Thayer *et al.* (2015) visade i en studie att människor enbart eliminerar konjugerad BPA via urinen efter peroral giva. Människor har således inte samma första passageeffekt som råttor har. Dock menar författarna att trots skillnader i elimination av BPA mellan råttor och människor vid peroral tillförsel fås liknande biotillgänglighet av okonjugerad BPA i den systemiska cirkulationen (Thayer *et al.*, 2015). Man kan följaktligen extrapolera effekter som observerats vid peroral tillförsel hos råttor till människor. Det är dock mer tveksamt att extrapolera resultat från studier där BPA administrerats intraperitonealt eller subkutant då detta ger en högre biotillgänglighet än vad människors vanliga exponeringsväg genererar.

En viktig felkälla att ha i åtanke vid peroral giva av BPA är risken att man inte uppnår eftersträvd exponeringsdos om råttorna inte äter eller dricker avsedd mängd preparerat foder eller vatten. I denna studie gjordes en jämförande kontroll av vattenåtgång för att beräkna mängden BPA som råttorna faktiskt fick i sig jämfört med eftersträvd dos (tabell 2). Under hela exponeringsperioden fick båda grupper i genomsnitt i sig ca 80 % av eftersträvd dos. Dock uppnåddes enbart 54 % av eftersträvd dos under perioden GD 3,5 till PND 0 i båda grupper. Detta är av relevans när man tolkar resultaten. Att ingen påverkan setts på antal antrala folliklar, CL, atretiska folliklar och förekomst av multioocyter i folliklar kan således ha en möjlig förklaring i att råttorna inte exponerades för den tänkta dosen.

Val av dos är en relevant punkt i studier av lågdoseffekter av BPA. Definition av låg dos i litteraturen är som tidigare nämnt 50 mg/kg/d och lägre (vom Saal *et al.*, 2007). Detta är en dos som baseras på LOAEL för kemikalien. En annan intressant siffra i sammanhanget är NOAEL för BPA, som är satt till 5 mg/kg/d (EFSA CEF Panel, 2015). Detta är en dos man har definierat

som den högsta exponeringsdos som inte ska ge upphov till observerbara negativa effekter i levande organismer. Att denna studie, inklusive andra studier på samma område, kan påvisa effekt vid en dos lägre än 5 mg/kg/d väcker frågetecken kring denna siffra. En förklaring kan vara att NOAEL-värdet inte stämmer och egentligen är lägre än vad man tidigare trott. En annan möjlig förklaring kan dock vara att effekt vid dosen 50 µg/kg/d påvisar att BPA följer en icke-monoton dos-responskurva. Fler studier behövs dock för att utröna vad som är fallet. Dagens TDI på 4 µg/kg/d är omdiskuterat och forskargrupper inom området föreslår en sänkning av detta värde, då man anser att det inte ger tillräckliga säkerhetsmarginaler för human exponering. I denna studie påvisades en påverkan på ovarievikten vid exponering för 50 µg/kg/d. Det är visserligen en dos som är högre än 4 µg/kg/d, men man kan fundera på om TDI har tillräckligt med säkerhetsmarginaler då biologiska effekter kan påvisas vid en dos enbart 12,5 gånger högre. I sammanhanget måste man ta hänsyn till att BPA inte är den enda hormonstörande kemikalien i närmiljön. Vi utsätts dagligen för en cocktail av kemikalier, som tillsammans skulle kunna generera en större effekt. Dessutom finns det studier som rapporterat effekter på ovarier vid perorala doser som är lägre än TDI, vilket är viktigt att notera (Gamez *et al.*, 2015; Santamaria *et al.*, 2016). Då det råder viss osäkerhet på detta område behövs fler studier med fokus på doser lägre än NOAEL och TDI för att belysa effekterna av låga doser BPA samt bidra till klarhet över huruvida BPA följer ett icke-monotont dos-responssammanhang eller ej.

Relevansen av kontroll av oavsiktlig miljömässig exponering gör sig påmind i studien av Delclos *et al.* (2014), där blodprov från råttorna analyserades av en annan forskargrupp med avseende nivåer av bioaktiv och konjugerad form av BPA (Churchwell *et al.*, 2014). Trots åtgärder att minimera oavsiktlig exponering av BPA från närmiljön (kontroll av foder samt material djuren var i kontakt med) kunde nivåer av konjugerad BPA påvisas i serum från både positiv och negativ kontrollgrupp. Dessa nivåer av konjugerad BPA var jämförbara med de nivåer som kunde uppmäts i den lägsta exponeringsgruppen som doserats med 2,5 µg/kg/d. Då konjugerad BPA bildas i metabolismen av kemikalien tyder detta på miljömässig exponering av djuren snarare än kontamination av serum efter provtagning (Churchwell *et al.*, 2014). Detta är väldigt intressant då det uppmärksammar oss på svårigheten att helt och hållet förhindra miljömässig exponering av BPA i toxikologiska studier av kemikalien. Även i vår studie vidtogs åtgärder i försök att hålla exponering av BPA kontrollerad. Dock har inga analyser av metaboliter från BPA gjorts i kontrollgruppen, vilket gör att man med ledning av resultat från Churchwell *et al.* (2014) inte helt kan utesluta miljömässig exponering som kan ha påverkat studieresultatet.

Ålder för exponering är också av betydelse. I WHO:s och UNEP:s rapport om hormonstörande kemikalier (Bergman *et al.*, 2013 för WHO/UNEP) anges att den känsligaste perioden för exponering av hormonstörande kemikalier är under fosterutveckling samt pubertet. Därav har många studier gjorda på ovariemorfologi exponerat råttor kring denna period i livet. Val av exakt exponeringsfönster skiljer sig dock mellan studier, vilket skulle kunna ha en möjlig koppling till de skilda resultat som rapporterats. Delclos *et al.* (2014) avviker i val av exponeringsfönster och blir extra intressant i sammanhanget då författarna här exponerat råttorna peroralt med kronisk tillförsel från början av dräktighet fram till avlivning, vilket mest

efterliknar den humana vardagliga exponeringen. I vår studie exponerades fostren från dräktighetsdag 3,5 och man kan spekulera i om effekt potentiellt hade kunnat ses på folliklarna om exponeringen hade påbörjats tidigare än så. Definitioner kring vad som mer precist utgör den känsliga perioden under tidig utveckling och standardisering av exponeringsfönster i toxikologiska studier av BPA skulle underlätta utvärdering och jämförelser av studieresultat.

Tidpunkt för utvärdering av ovarierna skulle kunna påverka vad man hittar för fynd. Denna tidpunkt skiljer sig från postnatal dag 8 till 169 i de studier som granskats i detta arbete. Rodríguez *et al.* (2010) och Gamez *et al.* (2015) utförde histopatologisk undersökning vid PND 8 respektive 30 och rapporterade en ökning av primärfolliklar, medan Li *et al.* (2014) och Santamaria *et al.* (2016) som undersökte ovarierna något senare (vid PND 35 respektive 90), rapporterade istället en minskning av denna follikeltyp. Man kan spekulera kring om effekterna av exponering av BPA under tidig utveckling skulle kunna skilja sig med åldern. Detta är i sammanhanget dock svårt att dra slutsatser om då dessa studier använt sig av olika administreringssätt samt exponeringsfönster, vilket kan ha haft inverkan på resultaten. Än igen gör sig relevansen av standardisering av studiedesign påmind så att olika fynd kan jämföras med varandra.

Råttorna i detta försök avlivades vid 12 månaders ålder, vilket är betydligt senare än i övriga studier. Pigmentinlagringar i form av lipofuscin är ett vanligt fynd hos åldrande råttor (Dixon *et al.*, 2014), vilket kunde observeras. Hos råttor i åldern 6–18 månader kan även åldersförändringar i form av follikelcystor ses, till följd av förlängningar i östrus-cykeln (Dixon *et al.*, 2014; Westwood, 2008). Follikelcystor observerades dock ej i denna studie. Dessa perioder av förlängd östrus, även kallat persisterande östrus, kan få till följd att CL upprätthålls längre än normalt i ovariet. Till slut når råttorna ett stadie av persistent anöstrus där ovulationen upphör och folliklar och CL försvinner helt (Westwood, 2008). Åldersrelaterade förändringar kan tänkas försvåra utvärderingen av organen. Att utvärdera ovarier från äldre råttor kan dock fylla vissa kunskapsluckor då de flesta studier på området utvärderat unga djur. I denna studie avlivades alla råttor vid samma ålder, vilket gör att eventuella åldersrelaterade förändringar inte bör ha påverkat jämförelserna mellan kontroll- och exponeringsgrupper.

Ett intressant fynd i ovarierna i vår studie var förekomst av flera oocyter i samma follikel. Enligt Dixon *et al.* (2014) uppstår dessa vid utvecklingen av primordialfolliklar i den neonatala gnagaren till följd av felaktigheter i de normala mekanismer som separerar oocyterna under denna process. Det är således inte en åldersförändring. Dessa multioocyter kan förekomma som normalvariation i låg frekvens hos råttor, med viss variation mellan stammar (Dixon *et al.*, 2014). Enligt Gamez *et al.* (2015) kan det även uppstå vid administration av ämnen med östrogen inverkan. Trots förekomsten av multioocyter kunde det i denna studie dock inte ses någon statistisk skillnad mellan kontroll och exponeringsgrupper, vilket gör att man kan spekulera i att förekomsten troligen beror på normalvariation.

Konklusion

Sammanfattningsvis visade resultaten i denna studie att exponering av BPA under tidig utveckling leder till en ökad ovarievikt hos råttor exponerade för 50 µg/kg/d. Inga effekter avseende antal antrala folliklar, CL, atretiska folliklar eller förekomst av multioocyter i folliklar kunde ses. Det är svårt att spekulera i vad viktökningen kan bero på och vad det kan få för konsekvenser för reproduktionen, då ingen övrig skillnad i ovarierna kunnat påvisas. Det är möjligt att det skulle kunna ha orsakats av skillnad i follikel- eller CL-storlek, eller skillnader i övriga follikelstadier. Då detta endast är en inledande studie av föreslås att dessa parametrar är något som undersöks i framtida utvärdering av ovarierna. Dessa resultat skiljer sig från vad andra studier inom detta område kommit fram till. Vid granskning av litteraturen blir det tydligt att det är svårt att uttala sig om vad man får för effekter av BPA i ovarier, då resultaten går i olika riktningar. För att med mer säkerhet kunna uttala sig om eventuella morfologiska effekter av BPA på råttors ovarier krävs att fler studier görs och att dessa är mer standardiserade.

REFERENSER

- Adewale, H. B., Jefferson, W. N., Newbold, R. R. & Patisaul, H. B. (2009). Neonatal Bisphenol-A Exposure Alters Rat Reproductive Development and Ovarian Morphology Without Impairing Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Biology of Reproduction*, vol. 81 (4), ss. 690-699.
- Bergman, Å., Heindel, J. J., Jobling, S., Kidd, K. A. & Zoeller, R.T. (red) (2013). State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012. Geneva: WHO; UNEP. Tillgänglig: <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/index.html> [2016-11-25]
- Brotons, J. A., Oleaserrano, M. F., Villalobos, M., Pedraza, V. & Olea, N. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environmental Health Perspectives*, vol. 103 (6), ss. 608-612.
- Churchwell, M. I., Camacho, L., Vanlandingham, M. M., Twaddle, N. C., Sepehr, E., Delclos, K. B., Fisher, J. W. & Doerge, D. R. (2014). Comparison of Life-Stage-Dependent Internal Dosimetry for Bisphenol A, Ethinyl Estradiol, a Reference Estrogen, and Endogenous Estradiol to Test an Estrogenic Mode of Action in Sprague Dawley Rats. *Toxicological Sciences*, vol. 139 (1), ss. 4-20.
- Delclos, K. B., Camacho, L., Lewis, S. M., Vanlandingham, M. M., Latendresse, J. R., Olson, G. R., Davis, K. J., Patton, R. E., da Costa, G. G., Woodling, K. A., Bryant, M. S., Chidambaram, M., Trbojevic, R., Juliar, B. E., Felton, R. P. & Thorn, B. T. (2014). Toxicity Evaluation of Bisphenol A Administered by Gavage to Sprague Dawley Rats From Gestation Day 6 Through Postnatal Day 90. *Toxicological Sciences*, vol. 139 (1), ss. 174-197.
- Dixon, D., Alison, R., Bach, U., Colman, K., Foley, G. L., Harleman, J. H., Haworth, R., Herbert, R., Heuser, A., Long, G., Mirsky, M., Regan, K., Van Esch, E., Westwood, F. R., Vidal, J. & Yoshida, M. (2014). Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Female Reproductive System. *Journal of Toxicologic Pathology*, vol. 27 (3 & 4), ss. 1-107.
- EFSA CEF Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids). (2015). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. *EFSA Journal*, vol. 13 (1). DOI:10.2903/j.efsa.2015.3978
- Gamez, J. M., Penalba, R., Cardoso, N., Bernasconi, P. S., Carbone, S., Ponzo, O., Pandolfi, M., Scacchi, P. & Reynoso, R. (2015). Exposure to a low dose of bisphenol A impairs pituitary-ovarian axis in prepubertal rats Effects on early folliculogenesis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 39 (1), ss. 9-15
- Hammar, M., Holte, J. & Brynhildsen, J. (2006). Gynekologisk endokrinologi. I: Werner, S. (red), Endokrinologi. Falköping: Liber, ss. 215-240.
- Hass, U., Christiansen, S., Boberg, J., Rasmussen, M. G., Mandrup, K. & Axelstad, M. (2016). Low-dose effect of developmental bisphenol A exposure on sperm count and behaviour in rats. *Andrology*, vol. 4 (4), ss. 594-607.
- Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y. & Taketani, Y. (2002). Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction*, vol. 17 (11), ss. 2839-2841.

- Kemikalieinspektionen (2013). Avgivning av bisfenol A (BPA) vid renovering av dricksvattenrör – Redovisning från ett regeringsuppdrag. Sundbyberg: Kemikalieinspektionen. (Rapport från Kemikalieinspektionen, 2013:7). Tillgänglig: <https://www.kemi.se/global/rapporter/2013/rapport-7-13.pdf> [2016-11-25]
- Kurebayashi, H., Betsui, H. & Ohno, Y. (2003). Disposition of a low dose of C-14-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicological Sciences*, vol. 73 (1), ss. 17-25.
- Lejonklou, M. H., Dunder, L., Bladin, E., Petterson, V., Rönn, M., Lind, L., Waldén, T. B. & Lind, M. (2016). Effects of Low-dose Developmental Bisphenol A Exposure on Metabolic Parameters and Gene Expression in Male and Female Fischer 344 Rat Offspring. *Environmental Health Perspectives*, *in press*
- Li, Y. C., Zhang, W. C., Liu, J., Wang, W. X., Li, H., Zhu, J. L., Weng, S. Z., Xiao, S. H. & Wu, T. T. (2014). Prepubertal bisphenol A exposure interferes with ovarian follicle development and its relevant gene expression. *Reproductive Toxicology*, vol. 44, ss. 33-40.
- Mandrup, K., Boberg, J., Isling, L.K., Christiansen, S. & Hass, U. (2016). Low-dose effects of bisphenol A on mammary gland development in rats. *Andrology*, vol. 4 (4), ss. 673–683.
- National Food Institute (2015). Evaluation of EFSA’s new Scientific Opinion on Bisphenol A. Søborg: Technical University of Denmark. Tillgänglig: http://www.food.dtu.dk/english/-/media/Institutter/Foedevareinstituttet/Publikationer/Pub-2015/Evaluation_BisphenolA.ashx?la=da [2016-10-25]
- Peretz, J., Vrooman, L., Rieke, W. A., Hunt, P. A., Ehrlich, S., Hauser, R., Padmanabhan, V., Taylor, H. S., Swan, S. H., VandeVoort, C. A. & Flaws, J. A. (2014). Bisphenol A and Reproductive Health: Update of Experimental and Human Evidence, 2007-2013. *Environmental Health Perspectives*, vol. 122 (8), ss. 775-786.
- Pottenger, L. H., Domoradzki, J. Y., Markham, D. A., Hansen, S. C., Cagen, S. Z. & Waechter, J. M. (2000). The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicological Sciences*, vol. 54 (1), ss. 3-18.
- Rodríguez, H.A., Santambrosio, N., Santamaría, C.G., Muñoz-de-Toro, M. & Luque, E. (2010). Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reproductive toxicology*, vol. 30 (4), ss. 550–557.
- Ross, R. H. & Pawlina, W. (2011). Histology: A Text and Atlas. 6 uppl., Baltimore: Lippincott, Williams and Wilkins.
- Santamaria, C., Durando, M., de Toro, M. M., Luque, E. H. & Rodriguez, H. A. (2016). Ovarian dysfunctions in adult female rat offspring born to mothers perinatally exposed to low doses of bisphenol A. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 158, ss. 220-230.
- Schonfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C. E., Paul, M. & Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environmental Health Perspectives*, vol. 110 (11), ss. 703-707.
- Takagi, H., Shibutani, M., Masutomi, N., Uneyama, C., Takahashi, N., Mitsumori, K. & Hirose, M. (2004). Lack of maternal dietary exposure effects of bisphenol A and nonylphenol during the

- critical period for brain sexual differentiation on the reproductive/endocrine systems in later life. *Archives of Toxicology*, vol. 78 (2), ss. 97-105.
- Takao, Y., Lee, H. C., Kohra, S. & Arizono, K. (2002). Release of bisphenol A from food can lining upon heating. *Journal of Health Science*, vol. 48 (4), ss. 331-334.
- Thayer, K. A., Doerge, D. R., Hunt, D., Schurman, S. H., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., Garantzotis, S., Kissling, G. E., Easterling, M. R., Bucher, J. R. & Birnbaum, L. S. (2015). Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environment International*, vol. 83, ss. 107-115.
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T. & Myers, J. P. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*, vol. 33 (3), ss. 378-455.
- Vandenberg, L. N., Ehrlich, S., Belcher, S. M., Ben-Jonathan, N., Dolinoy, D. C., Hugo, E. R., Hunt, P. A., Newbold, R. R., Rubin, B. S., Saili, K. S., Soto, A. M., Wang, H. & vom Saal, F. S. (2013). Low dose effects of bisphenol A An integrated review of in vitro, laboratory animal, and epidemiology studies. *Endocrine Disruptors*, vol. 1 (1).
- vom Saal, F. S., Akingbemi, B. T., Belcher, S. M., Birnbaum, L. S., Crain, D. A., Eriksen, M., Farabollini, F., Guillette, L. J., Jr., Hauser, R., Heindel, J. J., Ho, S. M., Hunt, P. A., Iguchi, T., Jobling, S., Kanno, J., Keri, R. A., Knudsen, K. E., Laufer, H., LeBlanc, G. A., Marcus, M., McLachlan, J. A., Myers, J. P., Nadal, A., Newbold, R. R., Olea, N., Prins, G. S., Richter, C. A., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., Soto, A. M., Talsness, C. E., Vandenberg, J. G., Vandenberg, L. N., Walser-Kuntz, D. R., Watson, C. S., Welshons, W. V., Wetherill, Y. & Zoeller, R. T. (2007). Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reproductive Toxicology*, vol. 24 (2), ss. 131-138.
- Wang, W., Hafner, K. S. & Flaws, J. A. (2014). In utero bisphenol A exposure disrupts germ cell nest breakdown and reduces fertility with age in the mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 276 (2), ss. 157-164.
- Westwood, F. R. (2008). The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology*, vol. 36 (3), ss. 375-384.
- Yoshida, M., Sanbuisso, A., Hisada, S., Takahashi, M., Ohno, Y. & Nishikawa, A. (2009). Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *Journal of Toxicological Sciences*, vol. 34, ss. 189-197.